

СРАВНЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ГАЛЛОВОЙ, КОФЕЙНОЙ И ХЛОРОГЕНОВОЙ КИСЛОТ

Е.И. Тарун

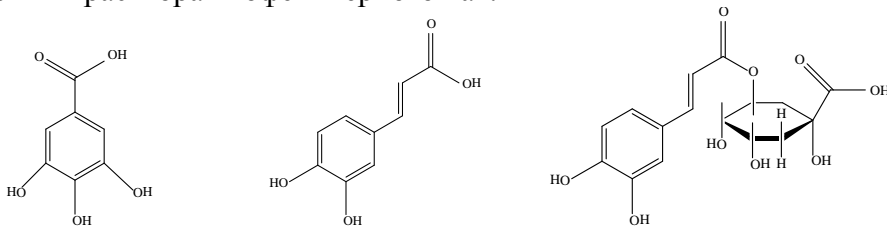
Международный государственный экологический университет им. А.Д. Сахарова, г. Минск, Республика Беларусь

Введение

Избыточная концентрация свободных радикалов в организме является центральным фактором риска сердечно-сосудистых, онкологических заболеваний и других патологий. Необходимость коррекции заболеваний, в которых важную роль играет свободно-радикальное окисление, определяет актуальность поиска перспективных средств антиоксидантной фармакотерапии [1–4]. Для коррекции патологических состояний и в профилактических целях рекомендуют лечебные средства. Очевидно, что направленное использование таких препаратов требует контроля их антиоксидантной активности. Метод определения антиоксидантной активности по отношению к активированным формам кислорода (АФК) является одним из наиболее применяемых в настоящее время [5–6]. Он основан на измерении интенсивности флуоресценции окисляемого соединения и ее уменьшении под воздействием АФК. В настоящей работе для детектирования свободных радикалов использован флуоресцеин, обладающий высоким коэффициентом экстинкции и близким к 1 квантовым выходом флуоресценции. Генерирование свободных радикалов осуществляли, используя систему Фентона, в которой образуются гидроксильные радикалы при взаимодействии комплекса железа (Fe^{2+}) с этилендиаминтетрауксусной кислотой (EDTA) и пероксида водорода [7–8].

В качестве ингибиторов радикальных процессов выбраны галловая, кофейная и хлорогеновая кислоты, обладающие сильными антиоксидантными свойствами [9–13] (рисунок 1). Представляет интерес сравнение активности близких по строению соединений для выявления вклада отдельных функциональных групп при связывании свободных радикалов, а также исследование их активности в различных биологических жидкостях. Известно, что галловая кислота содержится в листьях черного чая. Хлорогеновая кислота входит в состав кофейных зерен [14]. Представляет интерес сравнение антиоксидантной активности разных сортов черного чая и кофе и определение концентрации растворов этих продуктов, при которой достигается их максимальная антиоксидантная активность. Кроме того следует определить, насколько изменяются свойства хлорогеновой кислоты после ее обработки при обжарке зеленого кофе и приготовления растворимого кофе. Поэтому в качестве тестируемых биологических жидкостей были взяты растворы черного чая, зеленого, черного и растворимого кофе.

Целью данной работы было определение и сравнение антиоксидантной активности галловой кислоты и кофейной кислоты, а также определение и сравнение антиоксидантной активности хлорогеновой кислоты и галловой кислоты, содержащихся в биологических жидкостях – растворах кофе и черного чая.



галловая кислота

кофейная кислота

хлорогеновая кислота

Рисунок 1 – Структурные формулы галловой, кофейной и хлорогеновой кислот

Методы исследования

Использовали соль Мора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot \text{FeSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (Fe^{2+}), пероксид водорода (H_2O_2) фирмы «Реахим» (Россия), флуоресцеин, этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), галловую кислоту, кофейную кислоту фирмы «Sigma» (США).

Черный крупнолистовой цейлонский чай «Hyleys» фирмы «Regency Tess (Pvt) Ltd.» (Шри-Ланка), черный мелколистовой цейлонский чай «Dilmah» фирмы «MYF Teass (Pt) Ltd.» (Шри-Ланка).

Зеленый кофе фирмы «Caffe Promotion Sp. Z.O.O.» (Польша), черный молотый кофе «Café Exclusive» сорта «Arabica Premium» фирмы «Deutsche Extrakt Kaffee GmbH» (Германия), растворимый кофе «Millicano» фирмы «Jacobs monarch millicano» (Германия).

Растворы соли Мора, H_2O_2 , EDTA и флуоресцеина готовили в 0,1 М Na-фосфатном буфере, pH 7,4. Исходные растворы галловой и кофейной кислот готовили в диметилформамиде (ДМФ).

Приготовление раствора черного чая. Взвешивали 2 г черного чая и вносили в колбу на 50 мл. Заливали листья чая 20 мл кипяченой воды (100°C). Закрывали колбу и выдерживали 5 мин. Отфильтровывали раствор чая и делали ряд разведений: в 2, 5, 10, 50, 100, 500 раз. Концентрацию исходного раствора чая принимали за 100 %. Концентрации полученных разведений составляли: 100; 50; 20; 10; 2; 1; 0,2 %. Концентрации раствора черного чая в пробе уменьшались в 10 раз и составляли: 10; 5; 2; 1; 0,2; 0,1; 0,02 %.

Приготовление раствора зеленого кофе. Взвешивали 6 г молотого зеленого кофе и вносили в стакан на 50 мл. Приливали 25 мл кипяченой воды (100°C), нагревали, не доводя до кипения, выдерживали 15 мин. Отфильтровывали раствор кофе и делали ряд разведений: в 5, 10, 20, 50, 100, 500, 1000, 5000 раз. Концентрацию исходного раствора зеленого кофе принимали за 100 %. Концентрации полученных разведений составляли: 100; 20; 10; 5; 2; 1; 0,2; 0,1; 0,02 %. Концентрации раствора зеленого кофе в пробе уменьшались в 10 раз и составляли: 10; 2; 1; 0,5; 0,2; 0,1; 0,02; 0,01; 0,002 %.

Растворы черного и растворимого кофе готовили аналогичным образом.

Методика определения активности галловой кислоты. Общий объем пробы, помещаемый в кювету составлял 2 мл. В кювету вносили 0,02 мл флуоресцеина ($2 \cdot 10^{-6}$ М) и 1,98 мл 0,1 М Na-фосфатного буфера. Прописывали спектр. Полученное значения пика флуоресценции принимали за 100%.

В кювету вносили 0,02 мл флуоресцеина ($2 \cdot 10^{-6}$ М), 0,2 мл Fe^{2+} с ЭДТА (10^{-3} М), 1,58 мл 0,1 М Na-фосфатного буфера и 0,2 мл пероксида водорода (10^{-2} М). При взаимодействии Fe^{2+} с H_2O_2 (реакция Фентона) образующиеся радикалы подавляли свечение флуоресцеина. Полученное значения пика флуоресценции принимали за минимальное.

В кювету вносили 0,02 мл флуоресцеина ($2 \cdot 10^{-6}$ М), 0,2 мл Fe^{2+} с ЭДТА (10^{-3} М), 0,2 мл галловой кислоты (10^{-7} - 10^{-2} М) и 1,38 мл 0,1 М Na-фосфатного буфера. Реакцию начинали добавлением 0,2 мл пероксида водорода (10^{-2} М). Конечные концентрации: флуоресцеин – $2 \cdot 10^{-8}$ М, Fe^{2+} – 10^{-4} М, ЭДТА – 10^{-4} М, H_2O_2 – 10^{-3} М, галловая кислота – 10^{-8} - 10^{-3} М. Полученные значения пиков флуоресценции выражали в процентах, взяв за 100% флуоресценцию раствора без Fe^{2+} , ЭДТА, галловой кислоты и пероксида водорода.

Активность кофейной кислоты определяли аналогичным образом.

Методика определения общей антиоксидантной активности черного чая (ОАА). В кювету вносили 0,02 мл флуоресцеина ($2 \cdot 10^{-6}$ М), 0,2 мл Fe^{2+} с ЭДТА (10^{-3} М), 0,2 мл раствора черного чая (0,2 - 100 %) и 1,38 мл 0,1 М Na-фосфатного буфера. Реакцию начинали добавлением 0,2 мл пероксида водорода (10^{-2} М). Конечные концентрации: флуоресцеин – $2 \cdot 10^{-8}$ М, Fe^{2+} – 10^{-4} М, ЭДТА – 10^{-4} М, H_2O_2 – 10^{-3} М, раствор черного чая – 0,02 - 10 %. Полученные значения пиков флуоресценции выражали в процентах, взяв за 100% флуоресценцию раствора без Fe^{2+} , ЭДТА, раствора зеленого чая и пероксида водорода.

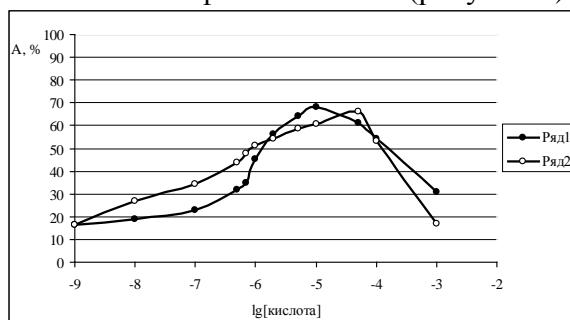
Методика определения ОАА зеленого кофе. В кювету вносили 0,02 мл флуоресцеина ($2 \cdot 10^{-6}$ М), 0,2 мл Fe^{2+} с ЭДТА (10^{-3} М), 0,2 мл раствора зеленого кофе (0,02 - 100 %) и 1,38 мл 0,1 М Na-фосфатного буфера. Реакцию начинали добавлением 0,2 мл пероксида водорода (10^{-2} М). Конечные концентрации: флуоресцеин – $2 \cdot 10^{-8}$ М, Fe^{2+} – 10^{-4} М, ЭДТА – 10^{-4} М, H_2O_2 – 10^{-3} М, раствор зеленого кофе – 0,002 - 10 %. Полученные значения пиков флуоресценции выражали в процентах, взяв за 100% флуоресценцию раствора без Fe^{2+} , ЭДТА, раствора зеленого кофе и пероксида водорода.

Активность черного и растворимого кофе определяли аналогичным образом.

Измерения флуоресценции проводили на флуориметре RF-5301 PC («Shimadzu», Япония). Регистрировали интенсивность флуоресценции на длине волны 514 нм. Длина волны возбуждения – 490 нм.

Результаты и обсуждение

В ходе исследования ингибирования реакций свободных радикалов, генерируемых в системе Фентона, получены зависимости интенсивности флуоресценции флуоресцеина (А) от логарифма концентрации галловой и кофейной кислот (рисунок 2).



1 –галловая кислота; 2 –кофейная кислота

Рисунок 2 – Зависимость интенсивности флуоресценции флуоресцеина (А), выраженной в %, от логарифма концентрации галловой и кофейной кислот

Положительный эффект при добавлении галловой и кофейной кислот проявлялся при их концентрации 10^{-8} М. При увеличении концентрации флавоноидов наблюдалось подавление действия свободных радикалов. Галловая кислота показала максимальное восстановление интенсивности флуоресценции флуоресцеина до 68% при наименьшей концентрации (10^{-5} М) по сравнению с кофейной кислотой. Кофейная кислота также оказалась достаточно сильным антиоксидантом. Она подавляла действие свободных радикалов на 66%. Однако при этом ее концентрация была в два раза выше, чем у галловой кислоты – $5 \cdot 10^{-5}$ М. При избытке концентрации галловой и кофейной кислот наблюдается снижение их активности. При высоких концентрациях этих соединений радикальные продукты их окисления могут взаимодействовать с флуоресцеином и снижать его флуоресценцию.

Основным показателем, характеризующим ингибиторную способность, является IC_{50} – концентрация антиоксидантов, при которой достигается 50% ингибирование свободных радикалов. В таблице 1 приведены значения IC_{50} для галловой и кофейной кислот, полученные из графиков зависимости интенсивности флуоресценции флуоресцеина от логарифма концентрации антиоксидантов. Они достаточно близки, хотя показатель IC_{50} для кофейной кислоты несколько ниже, что могло бы свидетельствовать о более высокой антиоксидантной способности. Однако антиоксидантная активность кофейной кислоты достигает максимума при более высокой концентрации, чем галловая кислота. Таким образом, галловая кислота является более сильным антиоксидантом. Очевидно, этому способствует наличие трех гидроксильных групп в бензольном кольце у галловой кислоты (рисунок 1), тогда как кофейная кислота содержит в бензольном кольце две гидроксильные группы. Известно, что именно гидроксильные группы являются ловушками радикалов.

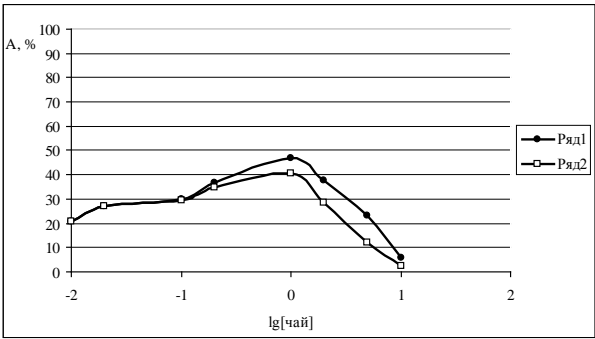
Таблица 1 – Показатели антиоксидантной активности галловой и кофейной кислот

Фенилпропаноиды	IC ₅₀ , М	A _{max} , %	C _{max} , М
галловая кислота	1,5·10 ⁻⁶	68	10 ⁻⁵
кофейная кислота	8·10 ⁻⁷	66	5·10 ⁻⁵

Примечание: A_{max} – интенсивность флуоресценции флуоресцеина, соответствующая максимальному ингибированию свободных радикалов, выраженная в %; C_{max} – концентрация антиоксиданта, при которой достигается максимальное ингибирование реакций свободных радикалов.

Листья черного чая содержат галловую кислоту. Для определения активности галловой кислоты были взяты два сорта черного чая: черный крупнолистовой цейлонский чай «Huleys» и черный мелколистовой цейлонский чай «Dilmah».

На рисунке 3 показана зависимость интенсивности флуоресценции флуоресцеина (А) от логарифма концентрации раствора черного чая.



1 – черный крупнолистовой цейлонский чай «Huleys»; 2 – черный мелколистовой цейлонский чай «Dilmah»

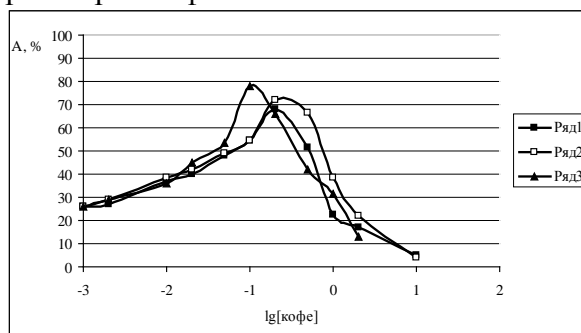
Рисунок 3 – Зависимость интенсивности флуоресценции флуоресцеина (А), выраженной в %, от логарифма концентрации раствора черного чая

Галловая кислота начинает проявлять антиоксидантную активность в растворах чая при концентрации 0,02% (разведение в 5·10³ раз). Максимальная активность галловой кислоты для всех сортов чая достигается при концентрации раствора чая 1% (разведение в 100 раз). Активность галловой кислоты в крупнолистовом черном чае «Huleys» выше, чем в мелколистовом черном чае «Dilmah», что говорит о более высоком качестве чая «Huleys». Его раствор восстанавливает интенсивность свечения флуоресцеина до 47 %, тогда как раствор чая «Dilmah» – до 40,6%. Увеличение концентрации чая выше 1% приводит к снижению антиоксидантной активности галловой кислоты. Ни в одном сорте чая галловая кислота не проявляет максимум своей активности. Очевидно, чай содержит вещества, препятствующие реакционной способности галловой кислоты. Однако, необходимо отметить схожесть графиков зависимости интенсивности флуоресценции флуоресцеина от концентрации галловой кислоты и аналогичных зависимостей для растворов черного чая. Можно предположить, что концентрация галловой кислоты, при которой наблюдается ее максимальная активность (10⁻⁵ М), будет совпадать с максимумом ее активности в растворах чая, что позволит рассчитать ее содержание в биологических жидкостях. Так как максимальная активность галловой кислоты в растворах черного чая наступает при растворении 200 мг чая в 200 мл воды, можно рассчитать, что при растворении 1г чая в 1 л воды высвобождается 1,88 мг галловой кислоты (10⁻⁵ М).

Кофейная кислота является составной частью хлорогеновой кислоты, калиевая соль которой находится в кофе. В результате гидролиза хлорогеновой кислоты высвобождается кофейная кислота. Можно предположить, что максимальную активность будет иметь хлорогеновая кислота, содержащаяся в зеленом кофе. Именно поэтому в последнее время

зеленый кофе активно рекламируется как антиоксидантный напиток. При обжарке кофе хлорогеновая кислота может разрушаться. Поэтому ее активность в черном кофе могла быть нулевой или меньше, чем в зеленом кофе. Для исследования активности хлорогеновой кислоты были взяты три вида кофе: зеленый, черный и растворимый кофе.

На рисунке 4 показана зависимость интенсивности флуоресценции флуоресцеина (А) от логарифма концентрации растворов кофе.



1 –зеленый кофе; 2 – черный кофе; 3 –растворимый кофе

Рисунок 4 – Зависимость интенсивности флуоресценции флуоресцеина (А), выраженной в %, от логарифма концентрации раствора кофе

Хлорогеновая кислота начинает проявлять антиоксидантную активность в растворах кофе при их концентрации 0,002% (разведение в $5 \cdot 10^4$ раз). В растворе зеленого кофе хлорогеновая кислота восстанавливает интенсивность свечения флуоресцеина до 68 % при концентрации раствора кофе 0,2 % (разведение в 500 раз). При той же концентрации хлорогеновая кислота восстанавливает интенсивность свечения флуоресцеина до 72 % в растворе черного кофе. В растворимом кофе хлорогеновая кислота восстанавливает интенсивность свечения флуоресцеина до 78 % при его концентрации 0,1% (разведение в 1000 раз). Повышение концентрации раствора кофе выше 0,5 % приводит к снижению активности хлорогеновой кислоты.

Хлорогеновая кислота наиболее активна в растворимом кофе. При этом ее концентрация в два раза меньше, чем в растворах зеленого и черного кофе. Несколько ниже ее активность в черном кофе. Самая низкая активность хлорогеновой кислоты в зеленом кофе. Таким образом, обжарка кофе не разрушает хлорогеновую кислоту и не влияет на ее активность. Более сильное измельчение черного кофе при получении растворимого кофе способствует лучшему высвобождению хлорогеновой кислоты в раствор. Активность хлорогеновой кислоты во всех трех видах кофе оказалась выше активности кофейной кислоты. Это можно объяснить положительным влиянием гликозидной части, входящей в состав хлорогеновой кислоты (рисунок 1), так как она содержит три дополнительных гидроксильных группы, являющихся ловушками радикалов.

Необходимо отметить схожесть графиков зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации кофейной кислоты и концентрации растворов зеленого, черного и растворимого кофе. Это доказывает возможность использования данной методики для определения антиоксидантной активности кофейной и хлорогеновой кислоты в биологических жидкостях.

Выводы

Сравнительные исследования галловой и кофейной кислот показали, что галловая кислота является более сильным ингибитором радикалов, достигая максимальной активности при более низкой концентрации, чем кофейная кислота, благодаря дополнительной гидроксильной группе, входящей в ее состав. Активность хлорогеновой кислоты в растворах кофе была выше активности кофейной кислоты благодаря положительному влиянию гликозидной части, входящей в состав хлорогеновой кислоты. Сравнение антиоксидантной активности растворов черного чая и кофе показало, что

активность хлорогеновой кислоты в растворах кофе была в 1,5-2 раза выше активности галловой кислоты в растворах черного чая. Самая высокая активность хлорогеновой кислоты была определена в растворе растворимого кофе, а самая низкая – в растворе зеленого кофе. Следует отметить, что максимальная активность галловой и хлорогеновой кислот в растворах черного чая и кофе проявляется при достаточно больших разведениях этих растворов (разведение в 100 раз для черного чая, разведение в 500 раз для зеленого и черного кофе, разведение в 1000 раз для растворимого кофе). При увеличении концентрации этих растворов антиоксидантная активность галловой и хлорогеновой кислот снижается, так как радикальные продукты их окисления могут взаимодействовать с флуоресцеином и снижать его флуоресценцию.

Полученные результаты показывают, что методика определения антиоксидантной активности галловой, кофейной и хлорогеновой кислот с помощью детектирования интенсивности флуоресценции флуоресцеина и ее уменьшения под воздействием АФК, генерирование которых осуществляли реакцией Fe^{2+} с H_2O_2 , может быть использована для определения их активности как в чистых растворах так и в биологических жидкостях.

Список литературы

- 1.Рюбен, К. Антиоксиданты/ К. Рюбен. – Москва: Крон-Пресс, 1998. – 224 с.
- 2.Оковитый, С.В. Клиническая фармакология антиоксидантов / С. В. Оковитый. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 602 с.
- 3.Halliwell, B. Free radicals in biology and medicine/ B. Halliwell, Y.M.C. Gutteridge // Fourth Edition Oxford: University Press, 2007. – 851 p.
- 4.Epicatechin attenuates atherosclerosis and exerts anti-inflammatory effects on diet-induced human-CRP and NFkB in vivo / M. Morrison [et al.] // Atherosclerosis, 2014. – Vol. 233, № 1. – P. 149–156.
- 5.Cao, G.H. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants/ G.H. Cao, H.M. Alessio, R.G. Cutler // Free Rad In Biology And Medicine. – 1993. – Vol. 3, №14. – P. 303–311.
- 6.Ehlenfeldt, M.K. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and phenolic and anthocyanin concentrations in fruit and leaf tissues of highbush blueberry/ M.K. Ehlenfeldt, R.I. Prior // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2001. – Vol. 49. – P. 2222–2227.
- 7.Сычев, А.Я. Гомогенный катализ соединениями железа/ А.Я. Сычев, В.Г. Исак – Кишинев: Штиинца, 1988. – 216 с.
- 8.Wei, Y. A novel H_2O_2 -triggered anti-Fenton fluorescent pro-chelator excitable with visible light/ Y. Wei // Chem. Commun., 2009. – Vol. 11. – P.1413–1415.
- 9.Куркин, В.А. Фенилпропаноиды – перспективные природные биологически активные соединения / В.А. Куркин. – Самара: СамГМУ, 1996. – 80 с.
- 10.Trandafir, I. Antioxidant capacity, phenolic acids and caffeine contents of some commercial coffees available on the Romanian market/ I. Trandafir, V. Nour, M. Ionica // Arch Latinoam Nutr. – 2013. – Vol. 63, № 1. – P. 87–94.
- 11.Influence of the solvents on the extraction of major phenolic compounds (punicalagin, ellagic acid and gallic acid) and their antioxidant activities in pomegranate aril / M. Singh [et al.] // J. Food. Sci. Technol. – 2014. – Vol. 51, № 9. – P. 2070–2077.
- 12.Asano, M. Caffeic Acid Inhibits the Formation of 7-Carboxyheptyl Radicals from Oleic Acid under Flavin Mononucleotide Photosensitization by Scavenging Singlet Oxygen and Quenching the Excited State of Flavin Mononucleotide/ M. Asano, H. Iwahashi// Molecules. – 2014. – Vol. 19, № 8. – P. 12486–12499.
- 13.Marino, T. Radical Scavenging Ability of Gallic Acid toward OH and OOH Radicals/ T. Marino, A. Galano, N. Russo// J Phys Chem B. – 2014. – Vol. 118, № 35. – P. 10380–10389.
- 14.Дейнеко, В.И. Хлорогеновая кислота плодов и листьев некоторых растений семейства Berberidaceae / В.И. Дейнеко, В.А. Хлебников, В.Н. Сорокопудов, И.П. Анисимов // Химия растительного сырья. – 2008. – №1. – С. 57–61.